

José Ranali

Influência da Ametopterinina, (methotrexato^(R)), sobre o crescimento dentario dos incisivos inferiores de ratos.

Dese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Unicamp - para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Piracicaba - 1976

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

Aos meus pais, exemplos de amor e perseverança...

Às minhas irmãs e cunhados, pelo incentivo e apoio...

À minha esposa, pelo afeto e compreensão nos momentos dificeis...

ofereço este trabalho

À Dr.^a WILMA PEREIRA BASTOS RAMOS, cuja orientação segura e efetiva deste trabalho, muito contribuiu para a minha formação científica...

Ao Dr. ARMANDO OCTÁVIO RAMOS, pelas sugestões apresentadas, bem como pela colaboração valiosa durante a redação deste trabalho.

Aos Professores Doutores

JONAS VAZ DE ARRUDA

ANTONIO CARLOS NEDER

exemplos de devotamento e honestidade dentro da carreira universitária, aos quais devo mi nha iniciação dentro do ensino e pesquisa, meu inesquecível reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo interesse e incentivo dispensado àqueles que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Merzel, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização do presente trabalho.

Aos colegas da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e do Curso de Pós Graduação em Farmacologia Aplicada à Clínica Odontológica, pelo apoio e compreensão, durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Flávio de Toledo Piza, pela correção do vernáculo.

À Sr^a Ivany do Carmo Guidolin Gerola e Sr^a Jurema Ferraz Cardoso, Bibliotecárias da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelas sugestões na bibliogra^fia apresentada.

À Srt^a Sônia Maria Aparecida Simionato Victória e Prof. Ulysses de Oliveira Martins, pelos serviços de datilografia.

Ao Sr. Sebastião Rodrigues de Barros, pelos serviços de impressão e encadernação deste trabalho.

C O N T E Ú D O

I - INTRODUÇÃO	Pag.	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	Pag.	7
III - SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA	Pag.	9
IV - RESULTADOS	Pag.	11
V - DISCUSSÃO	Pag.	35
VI - CONCLUSÕES	Pag.	37
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag.	38

*

*

*

I - INTRODUÇÃO

Devido à grande incidência de doenças neoplásicas, o estudo de drogas citotóxicas tornou-se de grande importância dentro da Farmacologia.

Os estudos dessas drogas iniciaram-se com a mostarda sulfurada, utilizada durante a I Guerra Mundial como arma química. Em 1919, KRUMBHAAR & KRUMBHAAR observaram que o envenenamento causado pela mostarda sulfurada se caracterizava por leucopenia e em casos fatais por aplasia da medula óssea, dissolução do tecido linfóide e ulceração do tecido gastrointestinal. Investigações realizadas em animais de laboratório por LYNCH & cols. (1918) e MARSHALL (1919), também demonstraram intoxicação sistêmica.

Após, pesquisou-se as ações das mostardas nitrogenadas, também armas de guerra química. Suas propriedades citotóxicas levaram GILMAN, GOODMAN e outros a estudarem o efeito desses agentes sobre linfossarcoma transplantado em camundongos, além de ensaios clínicos, abrindo-se, assim, as portas da quimioterapia das doenças neoplásicas. Os resultados não puderam ser divulgados na época, por estar a mostarda nitrogenada envolvida em segredo de guerra. Somente após o término da II Guerra Mundial é que suas pesquisas foram publicadas ou feitas revisões sobre o assunto (GOODMAN & cols., 1946; GILMAN & PHILIPS, 1946; DOUGHERTY, 1959 e GILMAN, 1963.)

Houve nessa época grande interesse pelo estudo desses agentes, surgindo um número elevado de trabalhos, envolvendo principalmente seus mecanismos de ação e possíveis aplicações terapêuticas. Basicamente podemos citar os estudos feitos por PHILIPS e cols. (1950); ROSS (1953); MONTGOMERY (1959); HALL & cols. (1960); FORKNER e cols. (1961); WHEELER (1962); MOQUIN & DAMESHEK (1963); WARWICK (1963); OCHOA & HIRSCHBERG (1967) e WHEELER (1967).

O capítulo das drogas citotóxicas apresenta um número bastante variado de agentes com atividade anticancerígena através de mecanismos de ação diferentes, como é o caso dos agentes alquilantes e dos antimetabólitos. Dentre o grupo dos antimetabólitos, os agentes antifólicos ocupam um lugar de destaque por produzirem remissões consideráveis, embora temporárias, de leucemia e por também produzirem remissões de longa duração na evolução do coriocarcinoma, tanto que HERTZ (1963) achou justificável o emprego da palavra "cura".

Constituíram também fato importante, no emprego dos antifólicos, os resultados clínicos obtidos por FARBER & cols. (1948), no tratamento da leucemia aguda em crianças, pois esses agentes podiam interromper, em alguns casos, a progressão dessa doença.

A partir daí, tornou-se evidente a apreciação da importância do ácido fólico na reprodução celular. Desta maneira, WELCH & HEINLE (1951) observaram que a administração de ácido fólico exacerbava certos tipos de leucemia aguda.

O primeiro antifólico sintetizado foi a aminopterina ou ácido 4-amino-pteróilglutâmico. Esse composto mostrou-se altamente tóxico e causava depressão da medula óssea em ratos, conforme os resultados obtidos por FRANKLIN & cols (1947).

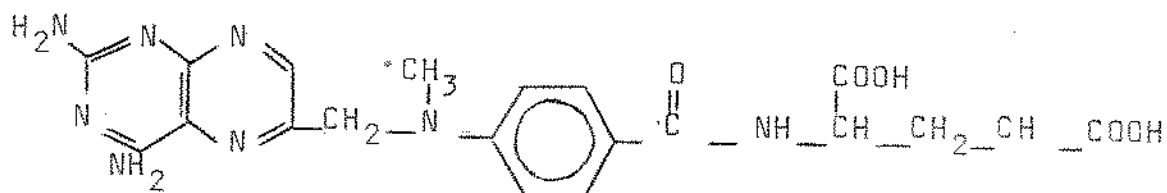
Desde então, vários antagonistas do ácido fólico têm sido sintetizados, dentre os quais o ametopterina ou ácido 4-amino-N¹⁰-metilpteróilglutâmico (SEEGER & cols., 1949), sendo atualmente o mais usado.

Trabalhos de HANDSCHUMACHER & WELCH (1960) e HACKETHAL & cols. (1961), demonstraram que para exercer o seu efeito biológico, o ácido fólico deve ser reduzido para a forma ativa que é o ácido 5,6,7,8-tetraidrofólico (FH₄). Para que essa conversão se realize o ácido fólico deve ser reduzido a ácido 7,8-diidrofólico (FH₂). Em seguida, há redução do ácido 7,8-diidrofólico para ácido 5,6,7,8-tetraidrofólico. Essas duas fases da conversão do ácido fólico se realizam com

o auxílio do sistema enzimático folato redutase. Os estudos sobre o mecanismo de ação dos antifólicos mostram que eles atuam inibindo a folato redutase, ou mais propriamente, a diidrofolato redutase, além de outros pontos de ação.

O ácido 5,6,7,8-tetraidrofólico está envolvido em reações essenciais na biossíntese de bases púricas e pirimidicas, portanto, de ácidos nucleicos, bem como de certos aminoácidos. Assim, os antifólicos, inibindo a formação de FH₄, acarretam prejuízo da reprodução celular.

Para o presente trabalho, escolheu-se a ametopterina cuja fórmula química estrutural é a seguinte:



A ametopterina é 10 vezes menos tóxica que a aminopterina, mas também é menos potente e dela difere por ter um radical metila ligado ao nitrogênio da posição 10.

Apesar de as células cancerígenas serem consideradas como estruturas endógenas agressoras e de poderem ser destruídas por agentes quimioterápicos, não existe possibilidade de que esses atuem somente no processo maligno, isto é, as drogas quimioterápicas são inespecíficas em sua ação. Devido a isso, grande parte dos tecidos normais do organismo, sob o tratamento de antineoplásicos, sofre suas ações tóxicas, sendo esses tecidos tanto mais atingidos quanto mais proliferativos e indiferenciados forem. Particularmente quanto à ametopterina, sua toxicidade tem sido estudada intensamente. PHILIPS & cols. (1950) através de pesquisas feitas em animais que receberam uma dose mínima letal, mostraram que eles sobrevivem pelo menos 48 horas e, geralmente, morrem em 3 a 5 dias

As características mais proeminentes de toxicidade fatal são anorexia, diarreia, leucopenia, depressão e coma. As lesões principais ocorrem no tecido intestinal e na medula óssea.

Com relação a outros antineoplásicos, LAVIN & KOSS (1971) efetuaram estudos histomorfológicos de vários órgãos de ratos tratados com ciclofosfamida na dose de 200 mg/kg, evidenciando uma interação do agente alquilante com os ácidos nucleicos dos hepatócitos do fígado, em contra partida com o aparecimento de necrose no epitélio do túbulo renal e epitélio da bexiga.

NORDLINDER (1971), pesquisou possíveis malformações em ratos adultos tratados com doses letais de ciclofosfamida em tecidos ósseos neoformados, encontrando como resultado malformações de narinas, orelhas e dentes incisivos, sendo que estes, em doses elevadas, algumas vezes não irrompiam.

KOPPANG (1973a-b), através de investigações com autoradiografia, mostrou que os odontoblastos em desenvolvimento são mais sensíveis à ciclofosfamida do que os já desenvolvidos, sendo que essa sensibilidade é refletida por uma diminuição da produção da dentina que envolve a polpa dental.

MASSINI (1976) também estudou o efeito da ciclofosfamida sobre o crescimento e desenvolvimento dos incisivos inferiores de ratos, encontrando uma inibição na velocidade de crescimento dos tecidos dentais; com doses altas, estes sofriam uma diminuição na capacidade de desenvolvimento.

Baseando-nos nesses estudos com a ciclofosfamida e considerando a grande toxicidade e efeitos colaterais provocados pela ametofterina, principalmente sobre os tecidos mais proliferativos, propusemo-nos a estudar seus possíveis efeitos em tecidos dentários.

O estudo prendeu-se principalmente a um aspecto inicial: usando doses terapêuticas de ametofterina, verificar o que aconteceria ao crescimento dos tecidos dentais dos ratos.

Sabe-se que o dente não é apenas um órgão estático e com função definida de trituração de alimentos. Mais que isso, ele tem valor como um indicador biológico, sendo registrado em seu desenvolvimento todo o equilíbrio metabólico do animal. Essa propriedade é importante, uma vez que permite conhecer certos aspectos da fisiologia, tanto geral, como dos tecidos dentais do animal.

A dentição do rato apresenta certas particularidades, sendo que uma delas foi que nos levou à escolha deste animal. Essa característica é que os incisivos crescem, calcificam-se e irrompem continuamente ao longo de toda a vida do animal, mostrando, portanto, em um dente único, o completo ciclo vital do desenvolvimento dos dentes, a partir de sua formação até a maturidade. Eles vão sendo também continuamente gastos pelo atrito nas suas faces incisais.

O incisivo não tem raiz, mas consiste de uma poderosa coroa, que pode ser dividida longitudinalmente em duas partes: a porção labial ou convexa coberta com esmalte e a porção lingual ou côncava que, da mesma forma que as laterais, é coberta por cemento. Durante o uso, o ápice do cone é gasto pelo atrito (uso funcional). O movimento alternado da maxila e mandíbula, para diante e para trás na mastigação, produz um desgaste do cemento e da dentina. Esse desgaste é muito mais rápido do lado lingual, onde o cemento e a dentina são relativamente mais moles do que na superfície labial, coberta com esmalte. Disso resulta uma borda parecida com um formão.

O dente se desenvolve de uma bainha elíptica - o epitélio odontogênico, que se acha localizada em sua base e que encerra o tecido conjuntivo da polpa primitiva. Esse anel epitelial determina o tamanho e a forma do corte transversal do futuro dente e continua proliferando ao longo da vida do animal.

Considerando as características dos incisivos de ratos, expostas acima, o objetivo do presente trabalho é verificar se a ametopterina possui alguma ação inibidora no crescimento dos tecidos dentais.

II - MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS UTILIZADOS

Os experimentos foram realizados em 35 ratos da raça Wistar, machos, com 30 a 35 semanas de idade e com peso médio de 300 gramas, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

Anestesia

Para a marcação dos incisivos e para as mensurações, os animais foram anestesiados com éter etílico, por inalação.

Marcação dos dentes do animal

No início do experimento, foi feita a marcação base nos dentes incisivos inferiores do animal, utilizando-se para isso um disco metálico de 3/4 de polegada, da marca Horico, adaptado a um mandril e fixado a uma peça de mão movida por um motor de baixa rotação (6.000 r.p.m.).

Após a anestesia do animal, era realizado um pequeno sulco na região labial dos incisivos inferiores esquerdo e direito, o mais perto do limite dento-gengival, porém sem ferir a mucosa gengival.

MENSURAÇÕES

Foram realizadas 4 mensurações a intervalos de 3 dias, sendo a primeira imediatamente após a marcação base, com o auxílio de um compasso de ponta seca, com o qual foi

tomada a medida diretamente sobre o dente; posteriormente, foi feita a leitura sob um paquímetro. O valor final anotado foi a representação da média de 3 medidas consecutivas, expresso em milímetros.

A medida do crescimento dentário corresponde à distância entre o limite dento-gengival e a marcação base executada.

Os animais foram pesados a cada realização das mensurações, com o objetivo de avaliar se a droga estaria alterando o ganho de peso.

DROGAS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

AMETOPTERINA, USP (METHOTREXATO^(R)), do Laboratório Lederle, em comprimidos de 2,5 mg. Os comprimidos foram dissolvidos em água destilada, obtendo-se uma solução de 250 μ g/ml.

A droga foi utilizada nas doses de 100 e 180 μ g/ml, injetada por via intraperitonéal.

ÉTER ETÍLICO, da Química Moura Brasil S/A, utilizado para a anestesia dos animais, por inalação.

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A avaliação estatística dos efeitos de doses da ametopterina e de dias de mensuração no crescimento dentário de ratos, foi realizado com auxílio de análise de variância simples. O teste "t" foi usado para averiguação de possíveis diferenças de crescimento entre os incisivos direito e esquerdo.

III - SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

MODELO EXPERIMENTAL

No presente trabalho, planejou-se estudar a influência causada pela ametopterina no crescimento e desenvolvimento dos tecidos dentários. O animal escolhido foi o rato, devido à característica de ter os incisivos em constante crescimento e desenvolvimento, permitindo a observação de qualquer variação desses parâmetros.

Para isso, o trabalho foi dividido em 3 grupos distintos. O primeiro grupo foi o controle, o segundo recebeu a droga durante 10 dias e o terceiro recebeu-a durante 18 dias.

Os grupos que receberam a droga, foram subdivididos em animais tratados com doses diferentes, isto é, 100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Marcação dos dentes incisivos inferiores do animal, com um pequeno sulco na face labial, perto do limite dento-gengival.

Injeção diária, por Via intraperitoneal, de ametopterina.

Mensuração a cada três dias, isto é, no 1º, 4º, 7º e 10º dias para os grupos que receberam a droga durante 10 dias e também para o grupo controle. Nos grupos tratados com a droga durante 18 dias, a mensuração foi realizada no 9º, 12º, 15º e 18º dias. Após feita a última mensuração os animais foram sacrificados com éter etílico.

ETAPAS DA PESQUISA

Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo 1 - Animais controle - animais não tratados com a droga, que tiveram seus incisivos inferiores marcados e nos quais foram realizadas as mensurações a cada três dias.

Grupo 2 - Animais tratados com ametofterina durante 10 dias - nesse grupo, os animais receberam o antimitótico através de injeções diárias pela via intraperitoneal, sendo seus incisivos inferiores medidos no 1º, 4º, 7º e 10º dias do experimento.

Sub-grupo 1 - animais tratados com ametofterina na dose de 100 µg/kg.

Sub-grupo 2 - animais tratados com ametofterina na dose de 180 µg/kg.

Grupo 3 - Animais tratados com ametofterina durante 18 dias - nesse grupo, os animais receberam a droga através de injeções diárias pela via intraperitoneal, sendo seus incisivos inferiores marcados no 9º dia e as medidas feitas no dia da marcação e aos 12º, 15º e 18º dias do experimento.

Sub-grupo 1 - os animais desse sub-grupo foram tratados com ametofterina na dose de 100 µg/kg.

Sub-grupo 2 - os animais desse sub-grupo foram tratados com ametofterina na dose de 180 µg/kg.

IV - RESULTADOS

GRUPO 1 - Animais controle

O crescimento dentário dos incisivos inferiores dos animais desse grupo, foi em 10 dias, em média de 4,8 mm.

Os resultados individuais constam nas Tabelas I a VI e as médias gerais nas Tabelas VII e VIII. A análise estatística pelo teste "t" demonstrou não haver diferença significativa entre o crescimento dos dentes direito e esquerdo.

Os animais desse grupo mantiveram estabilidade constante de peso, como pode ser verificado pela Tabela IX.

GRUPO 2 - Animais tratados com ametopterina durante 10 dias

Para os animais que receberam o antimitótico na dose de 100 µg/kg, houve, ao fim de 10 dias, em valores médios, um crescimento dentário dos incisivos inferiores de 4,3 mm, enquanto que para os animais que receberam a droga na dose de 180 µg/kg, o crescimento dentário dos incisivos inferiores foi de 4,1 mm. Esses resultados podem ser verificados através da Tabela VII.

Os resultados individuais das medidas realizadas aos 4º, 7º e 10º dias de observação constam nas Tabelas I, II e III respectivamente, cada uma delas seguidas da análise de variância (Tabelas I-A, II-A e III-A).

Os animais desse grupo, como pode ser verificado pelas Tabelas X e XI, tiveram uma discreta diminuição de peso. Para os animais que receberam a droga na dose de 100 µg/kg, o valor médio inicial de peso foi de 287 gramas, e no final do experimento, foi de 282 gramas. E para os animais que receberam a droga na dose de 180 µg/kg, o valor médio inicial

foi de 286 gramas, sendo o valor médio final, de 279 gramas. Nestes animais não foram observados sintomas de toxicidade da droga.

GRUPO 3 - Animais tratados com ametofterina durante 18 dias.

Neste grupo, os animais que receberam a droga na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tiveram, em valores médios, um crescimento dentário dos incisivos inferiores de 4,5 mm, em um período de 10 dias (contados a partir do 9º dia de tratamento, quando foi feita a marcação dos dentes), enquanto que no mesmo período, os animais tratados com a dose de 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tiveram um crescimento dentário dos incisivos inferiores de 4,4 mm. Os resultados podem ser vistos na Tabela VIII.

Os resultados individuais das mensurações feitas aos 4º, 7º e 10º dias estão respectivamente nas Tabelas IV, V e VI, seguidas das análises de variância correspondentes.

Pelas Tabelas XII e XIII, pode-se observar que os animais tiveram uma perda considerável de peso. Para aqueles que receberam a droga na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o valor médio inicial de peso foi de 268 gramas, enquanto que o valor médio final foi de 239 gramas. Para os animais que receberam a dose de 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o valor médio inicial foi de 257 gramas e o valor médio final foi de 224 gramas.

Além da diminuição do peso desses animais, também observou-se, após cerca de 15 dias de tratamento, sinais clínicos de intoxicação sistêmica causados pela droga. Os sintomas mais evidentes, tanto para os animais que receberam a droga na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, como para aqueles que receberam 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, foram: anorexia, perda de pelos, diarreia, lesões ulcerantes degenerativas nas regiões dos olhos, narinas, boca e, em alguns animais, também nas patas.

TABELA I

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no quarto dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	1,5	1,1	1,4
2	1,9	1,2	1,3
3	1,4	1,8	1,5
4	1,4	1,4	1,5
5	1,6	1,3	1,0
6	1,4	1,0	1,1
7	1,1	1,0	1,4
8	1,5	1,1	1,6
9	1,2	1,3	1,2
10	1,4	1,2	1,3
M É D I A S	1,4	1,2	1,3

TABELA I-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela I

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	0,21	0,10	2,12
RESÍDUO	27	1,34	0,05	
TOTAL	29	1,56		

G.L. = Grau de Liberdade
S.Q. = Soma dos Quadrados
Q.M. = Quadrado Médio

TABELA II

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no sétimo dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	3,1	2,9	2,8
2	3,6	3,0	2,7
3	3,1	2,3	2,8
4	3,0	2,8	2,2
5	2,5	3,1	2,3
6	3,0	2,8	2,7
7	2,4	2,6	2,5
8	3,2	2,6	2,8
9	3,1	2,4	2,3
10	2,1	2,3	2,4
M É D I A S	2,9	2,6	2,5

TABELA II-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela II

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	0,63	0,32	2,91
RESIDUO	27	2,98	0,11	
TOTAL	29	3,61		

G.L. = Grau de Liberdade

S.Q. = Soma dos Quadrados

Q.M. = Quadrado Médio

TABELA III

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no décimo dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	5,2	4,3	4,1
2	5,8	4,1	4,3
3	4,5	3,7	3,9
4	4,8	4,1	4,4
5	3,9	5,5	4,4
6	5,4	5,1	3,9
7	4,6	4,0	4,3
8	5,0	4,3	3,9
9	4,4	3,4	4,0
10	4,6	5,1	4,0
M É D I A S	4,8	4,3	4,1

TABELA III-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela III

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	2,53	1,27	4,81
RESÍDUO	27	7,12	0,26	
TOTAL	29	9,65		

G.L. = Grau de Liberdade
S.Q. = Soma dos Quadrados
Q.M. = Quadrado Médio

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

TABELA IV

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 18 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no quarto dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	1,5	1,2	1,6
2	1,9	1,9	1,7
3	1,4	1,3	1,1
4	1,4	1,7	1,8
5	1,6	1,6	1,5
6	1,4	1,3	1,8
7	1,1	1,2	1,4
8	1,5	1,7	1,6
9	1,2	1,3	0,6
10	1,4	1,9	1,7
M É D I A S	1,4	1,5	1,4

TABELA IV-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela IV

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	0,26	0,13	1,68
RESÍDUO	27	2,14	0,07	
TOTAL	29	2,41		

G.L. = Grau de Liberdade

S.Q. = Soma dos Quadrados

Q.M. = Quadrado Médio

TABELA V

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 18 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no sétimo dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	3,1	2,7	2,8
2	3,6	3,8	2,9
3	3,1	3,0	2,3
4	3,0	3,2	2,9
5	2,6	3,1	2,4
6	3,0	2,6	3,3
7	2,4	3,6	2,7
8	3,2	2,9	3,1
9	3,0	3,2	2,0
10	2,1	3,1	3,0
MÉDIAS	2,9	3,1	2,7

TABELA V-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela V

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	0,73	0,37	2,33
RESÍDUO	27	4,30	0,15	
TOTAL	29	5,03		

G.L. = Grau de Liberdade
S.Q. = Soma dos Quadrados
Q.M. = Quadrado Médio

TABELA VI

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 18 dias com ametofterina (100 e 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de ratos não tratados (Controle), no décimo dia de observação.

D E N T E S	Controle	Tratados com ametofterina	
		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	180 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	5,2	4,5	4,0
2	5,8	5,6	4,5
3	4,5	4,1	4,5
4	4,8	4,7	4,3
5	3,9	4,1	4,0
6	5,4	4,2	4,4
7	4,6	4,8	4,6
8	5,0	4,3	5,2
9	4,4	4,7	3,6
10	4,6	4,4	4,7
M É D I A S	4,8	4,5	4,4

TABELA VI-A

Análise de variância dos dados referentes a Tabela VI

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
DOSES	2	2,75	1,38	8,12
RESÍDUO	27	4,52	0,17	
TOTAL	29	7,27		

G.L. = Grau de Liberdade
S.Q. = Soma dos Quadrados
Q.M. = Quadrado Médio

T A B E L A VII

Comparação das médias de crescimento dentário em ratos tratados durante 10 dias com ametofterina e de ratos não tratados (Controle). Os valores são expressos em milímetros, e representam o crescimento médio dos incisivos direito e esquerdo nos diversos dias de mensuração e a média geral.

GRUPO	4º dia	7º dia	10º dia
Controle (5)	D - 1,32	2,74	4,78
	E - 1,56	3,06	4,84
	M - 1,44	2,90	4,82
100 µg/kg (5)	D - 1,12	2,54	4,38
	E - 1,36	2,82	4,34
	M - 1,24	2,68	4,36
180 µg/kg (5)	D - 1,26	2,54	4,02
	E - 1,32	2,56	4,22
	M - 1,30	2,55	4,12

D = Incisivo Direito

E = Incisivo Esquerdo

M = Média dos dois incisivos

Entre parentesis o número de ratos

T A B E L A VIII

Comparação das médias de crescimento dentário em ratos tratados durante 18 dias com ametofterina e de ratos não tratados (Controle). Os valores são expressos em milímetros e representam o crescimento médio dos incisivos direito e esquerdo nos diversos dias de mensuração e a média geral.

GRUPO	4º dia	7º dia	10º dia
Controle (5)	D - 1,32	2,74	4,78
	E - 1,56	3,06	4,84
	M - 1,43	2,91	4,82
100 µg/kg (5)	D - 1,68	3,28	4,68
	E - 1,54	3,16	4,60
	M - 1,51	3,12	4,54
180 µg/kg (5)	D - 1,40	2,82	4,50
	E - 1,54	2,66	4,26
	M - 1,48	2,74	4,40

D = Incisivo Direito

E = Incisivo Esquerdo

M = Média dos dois incisivos

Entre parêntesis o número de ratos

Obs.: Nos animais tratados, são considerados como 4º, 7º e 10º dias as medidas feitas após a realização da marcação dos dentes, isto é, no 12º, 15º e 18º dias.

T A B E L A IX

Peso (em gramas) dos animais do grupo controle no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

ANIMAIS	D I A S D E P E S A G E M			
	1º	4º	7º	10º
1	290	276	280	284
2	282	286	290	285
3	280	283	278	275
4	295	290	287	290
5	283	290	294	297
MÉDIA	286	285	285	286

TABELA X

Peso (em gramas) dos animais tratados com ametofterina durante 10 dias com a dose de 100 µg/kg, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

ANIMAIS	DIAS DE PESAGEM			
	1º	4º	7º	10º
1	280	282	278	275
2	292	290	285	286
3	302	300	298	295
4	285	285	282	280
5	276	274	278	275
MÉDIA	287	286	284	282

T A B E L A X I

Peso (em gramas) dos animais tratados com ametofterina durante 10 dias com a dose de 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

ANIMAIS	D I A S D E P E S A G E M			
	1º	4º	7º	10º
1	284	282	278	276
2	280	282	278	274
3	295	290	286	283
4	276	274	272	272
5	298	296	295	293
MÉDIA	286	284	281	279

T A B E L A XII

Peso (em gramas) dos animais tratados com ametofterina durante 18 dias com a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

ANIMAIS	D I A S D E P E S A G E M			
	1º	4º	7º	10º
1	270	262	255	240
2	280	275	268	254
3	260	250	241	236
4	276	262	253	240
5	258	240	236	228
MÉDIA	268	257	250	239

T A B E L A XIII

Peso (em gramas) dos animais tratados com ametofterina durante 18 dias com a dose de 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

ANIMAIS	D I A S D E P E S A G E M			
	1º	4º	7º	10º
1	252	244	236	226
2	260	252	241	227
3	258	246	232	223
4	246	235	225	218
5	272	259	246	230
MÉDIA	257	247	236	224

F I G U R A I

Marcação dos incisivos inferiores com motor de baixa rotação e disco metálico.



F I G U R A I I

Incisivos inferiores marcados



F I G U R A I I I

Medida do crescimento dentário com compasso



V - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no grupo controle se assemelham aos encontrados por FARRIS (1971), evidenciando que as condições de experimentação estavam satisfatórias e o crescimento dentário dentro dos limites da normalidade relatada. Por outro lado, como não se observou diferenças significativas do crescimento dentário entre os incisivos inferiores esquerdo e direito, possibilitou-se que se considerasse indistintamente o crescimento de cada dente.

Os animais do grupo controle mantiveram constância de peso, significando esse fato, que as suas condições físicas, no que tange à alimentação, foram propícias.

Nos grupos de animais tratados, notou-se que a ametopterina produziu discreta inibição no crescimento dentário dos incisivos inferiores. Notou-se também que essa inibição não dependeu do período de tratamento a que foram submetidos os animais, isto é, houve inibição mais acentuada no grupo de animais que recebeu a droga durante 10 dias, do que naquele tratado durante 18 dias. Isso leva a supor que, o tecido dentário é suscetível ao tratamento pelo antimitótico somente em determinado grau, observando-se com o prolongamento do tratamento, uma espécie de resistência à droga.

Por outro lado, o grupo de animais tratados durante um período de 18 dias, ao contrário dos tratados por 10 dias, mostrou, sem distinção das doses utilizadas, sinais evidentes de intoxicação sistêmica causados pela ametopterina.

Dessa maneira, pode-se aceitar que o tecido dentário é parcialmente suscetível à ação da droga em estudo, pois, do contrário haveria inibição mais acentuada do crescimento do dente.

Nossos resultados se revestem de interesse, pois a literatura não mostra esse tipo de estudo com relação aos an

tifólicos. Porém, KOPPANG (1973b), trabalhando com a ciclofosfamida, encontrou inibição na reprodução dos odontoblastos de ratos tratados com doses altamente tóxicas, que mataram a maioria dos animais. O mesmo autor, trabalhando com doses menores, encontrou pequena inibição na reprodução dos odontoblastos, e também um pequeno número de mitoses interrompidas.

Não se pode afirmar que a ametofterina atue de forma similar à ciclofosfamida, pois a sua ação antimitótica é indireta, isto é, ela age em uma fase primária da reprodução celular. Fundamentalmente, impede a transformação do ácido fólico para ácido 5,6,7,8-tetraidrofolico, bloqueando a atividade da enzima diidrofolato redutase.

MASSINI (1976), estudando a ação da ciclofosfamida sobre o crescimento dentário de ratos, através do mesmo método utilizado neste trabalho, encontrou inibição bem mais acentuada do tecido dentário do que a encontrada com a ametofterina, sendo que esta inibição pela ciclofosfamida foi realmente efetiva após um período de latência que coincidiu com o período de 10 dias.

Dessa forma, apesar do método simples utilizado em nossos experimentos, pode-se concluir que a ametofterina tem atividade inibitória discreta do crescimento dentário de ratos independentemente do tempo de tratamento e das doses utilizadas neste trabalho.

VI - CONCLUSÕES

A ametopterina foi capaz de inibir o crescimento dentário de ratos, em doses que não causaram o aparecimento de sinais de intoxicação ou perda de peso. O aumento da dosagem ou da duração do tratamento, embora acarretassem o aparecimento de efeitos tóxicos, não causaram maior grau de inibição do crescimento dentário.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOUGHERTY, T.F. Lymphocytokaryorrhectic effects of adrenal cortical steroids. In: REBUCK, J.W., ed. Lymphocytic tissue. New York, Paul B. Hoeber, 1959. p. 143-54.
- FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.D.; SYLVESTER, R.F.; WOLF, V.A. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). New Engl. J. Med., 238: 787-93, 1948.
- FARRIS, E.J. & GRIFFITH Jr., J.Q. The rat in laboratory investigation. New York, Hafner, 1971. 542 p.
- FOKNER, C.E.; BURCHENAL, J.H.; FRIEDMAN, M.; GELLHON, A.; KARNOFSKY, D.A. Advances in the management of lymphomas. - Bull. N.Y. Acad. Med., 37: 251-76, 1961.
- FRANKLIN, A.L.; STOKSTAD, E.L.R.; JUKES, T.H. Acceleration of pteroylglutamic acid deficiency in mice and chicken by a chemical antagonist. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 65: 368, 1947.
- GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. Am. J. Surg., 105: 575-8, 1963.
- GILMAN, A. & PHILIPS, F.S. The biological actions and therapeutic applications of the -chloroethylamines and sulfides. Science, 103: 409-915, 1946.
- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., eds. As bases farmacológicas da terapêutica. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1973 p. 1246-89.
- GOODMAN, L.S.; WINTROBE, M.M.; DAMESHEK, W.; GOODMAN, M. J.; GILMAN, A.; MCLENNAN, M. Nitrogen mustard therapy: use of methylbis (B-chloroethyl) amino hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied

- miscellaneous disorders. J.Am.med.Ass., 132: 126-32, 1946.
- HACKETHAL, C.A.; GOLBEY, R.B.; TAN, C.T.C.; KARNOSFSKY, D.A.; BURCHENAL, J.H. Clinical observations on the effect of streptonigrin in patients with neoplastic disease. Antibiotics Chemother., 11: 178, 1961.
- HALL, B.E.; WILLET, F.M.; HALES, D.R. Observations on the effects of alkylating agents in human neoplastic disease. A. intern. Med., 52: 602-25, 1960.
- HANDSCHUMACHER, R.E. & WELCH, A.D. Agents which influence nucleic acid metabolism. In: CHARGOFF, E. & DAVIDSON, J. N., eds. The nucleic acids. New York, Academic Press, 1960. v. 3, p. 453-526.
- HERTZ, R. Folic acid antagonists: effects on the cell and the patient. Clinical staff conference at N.I.H. A. intern. Med., 59: 931-56, 1963.
- KOPPANG, H.S. Autoradiographic investigations on the dentinogenesis of the rat incisor. Scand. J. dent. Res., 81: 397-405, 1973a.
- _____. Histomorphologic investigations on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor. Scand. J. dent. Res., 81: 383-96, 1973b.
- KRUMBHAAR, E.B. & KRUMBHAAR, H.D. The blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning: changes produced in the bone marrow of fatal cases. J. Med. Res., 40: 497-507, 1919.
- LAVIN, P. & KOSS, L.G. Effects of a single dose of Cyclophosphamide on various organs in the rat. Am. J. Path., 62: 159-63, 1971.
- LYNCH, V.; SMITH, H.W.; MARSHALL Jr., E.K. On dichloroethylsulphide (Mustard gas). The systemic effects and mechanism of action. J.Pharmac.exp.Ther., 12: 265-90, 1918.

- MARSHALL Jr., E.K. Mustard gas. J.Am.Ass., 73: 684-6, 1919.
- MASSINI, H. Estudo do crescimento dentário em ratos tratados com Ciclofosfamida (Enduxan^(R)). Piracicaba, 1976, |Tese (Mestrado) F.O.P. |
- MONTGOMERY, J.A. The relation of anti-cancer activity to chemical structure. Cancer Res., 19: 447-63, 1959.
- MOQUIN, R.B. & DAMESHEK, W. Use of alkylating agents in neoplasm of the hematopoietic system. Tufts Folia med., 9: 1-9, 1963.
- NORDLINDER, H. Malformations in newborn rats treated with a single dose of Ciclophosphamide. Acta Soc. Med. upsal. 76: 87-90, 1971..
- OCHOA, M. & HIRSCHBERG, E. Alkylating agents. In: SCHNITZER, R.J. & HAWKING, F., eds. Experimental Chemotherapy. New York, Academic Press, 1967. p. 1-132.
- PHILIPS, F.S.; THIERSCH, J.B. ; FERGUSON, F.C. Studies on the action of 4 aminopteroylglutamic mammals. A. N. Y. Acad. Sci., 52: 1349-59, 1950.
- ROSS, W.C.J. Chemistry of cytotoxic alkylating agents. Adv. Cancer Res., 1: 397-449, 1953.
- SEEGER, D.R.; COSULICH, D.B.; SMITH, J.M. ; HULTQUIST, M.E. A specially purified sample of 4-amino-N¹⁰-methylpteroyl glutamic acid (Amethopterin). J.Am.chem.Soc., 71:1753, 1949.
- WARWICK, G.P. The mechanism of action of alkylating agents. Cancer Res., 23: 1315-33, 1963.
- WELCH, A.D. & HEINLE, R.W. Hematopoietic agents in macrocytic anemias. Pharmac. Rev., 3: 345, 1951.
- WHEELER, G.P. Studies related to the mechanism of action of cytotoxic alkylating agents. Cancer Res., 22:651-88, 1962.

WHEELER, G.P. Some biochemical effects of alkylating agents.
Fedn.Proc.Fedn.Am.Socs.exp.Biol., 26: 885-92, 1967.